

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2004 年 4 月 22 日 (22.04.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/033716 A1

- (51) 国際特許分類: C12Q 1/48, G01N 33/50 (72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 石塚 保行  
(ISHIZUKA, Yasuyuki) [JP/JP]; 〒215-0015 神奈川県  
(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/009493 川崎市麻生区 虹ヶ丘 1 丁目 11-3 Kanagawa (JP).  
(22) 国際出願日: 2003 年 7 月 28 日 (28.07.2003) (74) 代理人: 渡邊 薫 (WATANABE, Kaoru); 〒105-0014 東  
京都 港区 芝 3 丁目 4 〇 番 4 号 シャイン三田ビル 5F  
(25) 国際出願の言語: 日本語 天野・渡邊国際特許事務所 Tokyo (JP).  
(26) 国際公開の言語: 日本語 (81) 指定国 (国内): CA, CN, KR, RU, US.  
(30) 優先権データ: (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, CH, DE, DK, ES,  
特願 2002-298177 FI, FR, GB, GR, IT, PT, SE).  
2002 年 10 月 11 日 (11.10.2002) JP 添付公開書類:  
— 国際調査報告書  
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社  
エーシーバイオテクノロジーズ (APPLIED CELL  
BIOTECHNOLOGIES, INC.) [JP/JP]; 〒305-0028 茨城  
県 つくば市 妻木 210 番地 4 Ibaraki (JP).  
2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: EXAMINATION METHOD AND EXAMINATION DIAGNOSTIC FOR PERIODONTAL DISEASE

(54) 発明の名称: 歯周病の検査方法及び検査診断薬

A	検 体	$\gamma$ -GTP 活性 (U)	B
	1	9. 8	
	2	1 5. 9	
	3	1 4. 0	
	4	2 5. 3	
	5	2 1. 5	
	6	1 5. 9	
	7	1 5. 9	
	8	6. 1	
	9	4 4. 0	
	10	1 0. 6	
C	11 (比較検体)	0	
C	12 (比較検体)	0	
C	13 (比較検体)	0	
C	14 (比較検体)	0. 7	

A...SPECIMEN  
B... $\gamma$ -GTP ACTIVITY (U)  
C...COMPARATIVE SPECIMEN

(57) Abstract: It is intended to provide an examination method and an examination diagnostic whereby the progress of periodontal disease can be appropriately estimated. Namely, a method of examining periodontal disease wherein the activity of  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase, which participates in the induction of the differentiation of osteoclasts and is found out as occurring in crevicular infusion known as showing an increased flow due to periodontal disease, is assayed; and a diagnostic for examining periodontal disease which contains at least a substance reacting with the above-described  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase such as an anti- $\gamma$ -GTP antibody.

(57) 要約: 歯周病の進行予測を的確に行うことができる歯周病の検査方法及び検査診断薬を提供することであって、歯周病によって流出量が増加することが知られている歯肉溝滲出液に発現することが判明した破骨細胞の分化誘導に関与する $\gamma$ -グルタミルトランスぺプチダーゼの活性を測定する歯周病の検査方法を提供するとともに、前記 $\gamma$ -グルタミルトランスぺプチダーゼと反応する物質、例えば抗 $\gamma$ -GTP抗体を少なくとも含有する歯周病の検査診断試薬を提供する。

## 明細書

### 歯周病の検査方法及び検査診断薬

#### 技術分野

本発明は、歯周病の検査方法及び検査診断薬に関する。より詳細には、γ-グルタミルトランスぺプチダーゼをマーカーとする歯周病の生化学的な検査方法及び歯周病の検査試薬に関する。

#### 背景技術

歯周病は、歯のまわりの歯周組織が徐々に壊されていく慢性の病気である。一般には、根端性歯周炎や歯周組織にできた腫瘍を除いて、それ以外の歯周組織に係わる病気を一括して歯周病（又は歯周疾患）と呼んでいる。

現在、60歳以上の80%が歯周病であるという知見があり、今後、高齢化の進行に伴い患者数が増大することが予測される。近年は、中年の患者も増加し、例えば日本国においては、国民病の様相を呈しており、現在、医療機関で治療を受けている患者は3,000万人以上、潜在患者も同数以上存在すると考えられ、歯周病の医療費は、約5,000億円に達し、歯科医療費の2割に相当する。

現在までの研究によって、歯周病の原因が細菌であることや症状の進行過程等について明らかにされている。

歯周病の症状としては、歯肉が腫れたり、食事の時や歯を磨く時に歯肉から出血したり、口臭が増したり、歯肉を押すと歯のまわりから膿が出たりすることが挙げられる。

だが、殆どの歯周病は、痛み等の自覚症状がないままに静かに経過するため、歯がぐらつく等の異常に気付いた時には、既に手遅れの状態で、歯を支える歯槽骨の大半が失われている場合も少なくない。

また、歯周病は、ゆっくり進行するが周期性があり、ほとんど症状を示さない静止期とその後続く激しい急性炎症と破壊によって、歯と歯肉の間に亀裂（一般に、「歯周ポケット」と称される。）が生じ、更に、歯のまわりの結合組織が壊され、歯槽骨が吸収される。外部から観察すると、歯肉が痩せて退宿し、歯根が現れるようになって、やがては歯がぐらついて、最終的には歯が抜け落ちてしまう。

ここで、現在普及している歯周病の検査診断法としては、レントゲン写真を撮って骨の吸収の度合いを目視で判断する方法、歯周ポケットの深さや細菌の付着レベルを測る方法がある。また、プロービング時の出血（歯周ポケットにプローブという器具を入れた時に出血があるかどうか）や歯の揺動度を調べる方法、プラーク（歯垢）中の細菌数を測定し、菌の種類を同定する方法等がある。

そして、酵素活性測定を利用する歯周病検査方法として、口腔から採取した検体をアルカリフォスファターゼ活性測定用基質と反応させ、その発色の程度を肉眼で観察して、歯肉炎、歯周炎等の歯周疾患の程度を予測する方法（日本国公開特許公報5-176796号公報）、歯肉溝滲出液に含まれるコラゲナーゼの酵素活性を測定する方法（日本国公開特許公報61-71000号公報）等が提案されている。

しかしながら、前掲した従来の歯周病の検査診断法では、歯周病の発症を把握することはできても、病気の進行を的確に予測することは難しかった。このため、依然として、歯周病の進行を客観的に予測することができる有力な検査方法の開発が望まれている。

自覚症状がないままに進行する歯周病への対策は、発症の早期発見と病気の進行予測が特に重要である。炎症の初期に歯槽骨の破壊の程度が予測できれば、即ち、歯槽骨破壊の早期診断ができれば、患者の早期治療への取り組みを促し、歯周病の的確な治療を行うことができる。

そこで、本発明は、歯周病の炎症に伴って発生する歯槽骨破壊の程度を、破骨細胞を分化誘導する活性がある酵素、即ちγ-グルタミルトランスペプチダーゼの活性を調べることによって把握し、歯周病の

進行予測を的確に行うことができる歯周病の検査方法及び検査診断薬を提供することを目的とする。

#### 発明の開示

上記目的を達成して技術的課題を解決するために、本発明では、以下の手段を採用する。

まず、本発明では、本願発明者らが、歯周病患者の歯肉溝滲出液に、 $\gamma$ -グルタミルトランスぺプチダーゼ酵素（慣用名。以下「 $\gamma$ -GTP」と略称する。）が発現しているという事実を新規に見出したことに基づいて、この $\gamma$ -GTPの活性を測定する歯周病の検査方法を提供する。

なお、歯肉溝滲出液（gingival crevicular fluid）は、歯肉に炎症が起こるとその流出量が増加することが知られており、 $\gamma$ -GTPは、グルタチオンをはじめとする $\gamma$ -グルタミルペプチドを加水分解するとともに、 $\gamma$ -グルタミル基を他のアミノ酸やペプチドに転移させる酵素として知られている。

本発明において検査マーカーとして用いる $\gamma$ -GTPは、現在、肝疾患等の検査診断で一般的に用いられている $\gamma$ -GTP活性測定法、抗 $\gamma$ -GTP抗体（ $\gamma$ -GTPと特異的に結合する抗体）と $\gamma$ -GTP蛋白質との反応を活用した直接検出法、又はPCR（polymerase chain reaction: 合成酵素連鎖反応）法によって $\gamma$ -GTPをコードするmRNAの発現を確認する方法等から選択される公知の手法に基づいて、簡易かつ確実に検出することが可能である。

即ち、 $\gamma$ -GTPの検出又は測定は確立された公知の手段で簡易かつ確実に行うことができるという利点がある。

また、本発明では、 $\gamma$ -GTPと反応（相互作用）する物質を少なくとも含有する歯周病の検査診断試薬を提供する。

$\gamma$ -GTPと反応する物質は、例えば、抗 $\gamma$ -GTP抗体（ $\gamma$ -GTPと特異的に結合する抗体）である。これによって、歯周病進行に伴う炎症によって進行する歯槽骨破壊（破骨細胞の分化誘導）のマーカー

一となる  $\gamma$ -GTP の発現を簡便にかつ速やかに確認することが可能となる。なお、前記検査診断薬を備える歯周病の検査診断専用の検査キットも提供できる。

以上のように、 $\gamma$ -GTP を歯周病のマーカーとして用いれば、歯周病の検査、診断、進行予測が可能な歯周病の生化学的検査診断手法を提供できるという第 1 の技術的意義、そして、 $\gamma$ -GTP の測定方法又は検出方法は既に医療分野等において確立されている技術があるので、歯周病の生化学的な検査診断方法を医療分野に容易かつ迅速に普及させることができるという第 2 の技術的意義を有する。

#### 図面の簡単な説明

第 1 図 (表) は、実験結果を示す図 (表) である。

#### 発明を実施するための最良の形態

まず、本発明に係る歯周病の検査方法の好適な実施例としては、歯周病患者の歯肉溝滲出液を患者から採取し、この歯肉溝滲出液中の  $\gamma$ -GTP の活性を、例えば、現在肝疾患等の検査診断で一般的に用いられている公知の  $\gamma$ -GTP 活性測定法によって確認する方法を挙げることができる。

この測定値が高い場合には、歯周病疾患であるとの検査及び診断を行うことができる。なお、 $\gamma$ -GTP 活性測定法の原理は、例えば、N-(DL- $\gamma$ -glutamyl) aniline (I) を基質にし、アクセプターとしてアミノ酸 (II) を加え、反応生成物のアゾ色素を比色するというもので、市販キットを適宜利用して実施することができる。

また、本発明では、 $\gamma$ -GTP 活性が同じでも蛋白質が異なるものも存在し得ることから、抗  $\gamma$ -GTP 抗体と特定の  $\gamma$ -GTP 蛋白質との特異的な抗原抗体反応を利用した直接検出法 (免疫学的手法) によって、直接この  $\gamma$ -GTP 蛋白質の発現を確認し、歯周病の検査及び診断を確実にを行うという実施形態をより好適に採用することもできる。

ここで、 $\gamma$ -GTP 蛋白質は、破骨細胞の形成活性や骨破壊との関連で発現するものが、歯周病検査のためのマーカーとして好適と考えられる。抗  $\gamma$ -GTP 抗体は、この  $\gamma$ -GTP 蛋白質と特異的に結合するものであればよく、特に限定されない。歯周病患者から特異的に発現される特定の  $\gamma$ -GTP 蛋白質を直接検出することにより、歯周病の診断を確実に行うことができる。

更には、公知の RT-PCR (polymerase chain reaction: 合成酵素連鎖反応) 法により  $\gamma$ -GTP 蛋白質をコードする mRNA 発現を確認する方法に基づいて、 $\gamma$ -GTP の発現を確認し、歯周病疾患であるとの検査及び診断を行う実施形態も採用することができる。

なお、上記以外の方法でも、 $\gamma$ -GTP 蛋白質を確実に検出できる方法であれば、本発明の実施例の一つとして採用できる。

例えば、抗体を用いたイムノアッセイ法としては、ラジオイムノアッセイ (RIA) 並びに酵素抗体法 (ELISA)、ラジオアイソトープを使わない競合的酵素抗体法 (EIA) などを挙げることができる。また、ピアコア等のバイオセンサー装置を用いた  $\gamma$ -GTP 蛋白質の検出も可能である。

次に、本発明に係る歯周病の検査診断試薬の好適な実施形態としては、例えば  $\gamma$ -GTP と特異的に結合する抗  $\gamma$ -GTP 抗体を少なくとも含有する構成を備える試薬が考えられる。

なお、この試薬の具他の形態は広く解釈されるものであり、更には、この試薬を備える検査診断キットや抗  $\gamma$ -GTP 抗体等をリガンドに備える検出表面を持つバイオセンサーチップ等も提供することができる。

#### 実施例。

歯周病患者 10 名から抜歯した抜去歯を提供してもらい、この抜去歯を洗浄せずにチューブに入れて、抜去歯が浸るように 1 ml の生理食塩水 (PBS) を入れて、4℃、24 時間放置し、前記抜去歯に付いた歯周組織の  $\gamma$ -GTP を溶出させた。その後、得られた溶出液を

フィルターでろ過して滅菌し、測定用の溶出液を得た。この溶出液中の  $\gamma$ -GTP 活性は、協和メデックス（株）社製・デタミナーL（登録商標）キットを用いて測定した。なお、この測定は、前記溶出液 1 ml 中の 60  $\mu$ l を用いた。

なお、比較検体は、歯周病ではない虫歯患者からの抜去歯（検体番号 11）、歯が健康で歯矯正の際に抜歯した抜去歯（検体番号 12～14）をそれぞれ用いて、上記同様の方法で  $\gamma$ -GTP 活性を測定した。測定結果を添付した第 1 図に示す。

この第 1 図に示されているように、歯周病を発症した患者 10 名（検体番号 1～10）の抜去歯の溶出液中の  $\gamma$ -GTP 活性は高く（平均 17.9 U）、一方、歯周病ではない虫歯患者からの抜去歯の溶出液（検体番号 11）の  $\gamma$ -GTP 活性は 0 であり、また、歯が健康で歯矯正の際に抜歯した抜去歯の溶出液（検体番号 12～14）においては、 $\gamma$ -GTP 活性は、平均 0.2 U であった。

なお、上記実験例では、歯周病を発症した患者 10 名の唾液中に含まれる  $\gamma$ -GTP 活性を測定したところ、約 1 U 程度であることが確認できた。このことから、検体番号 1～10 から得られた溶出液中の  $\gamma$ -GTP の大部分は、歯肉溝滲出液由来のものであることが確認できた。

以上の実験結果から、歯周病を発症した患者の歯肉溝滲出液中には  $\gamma$ -GTP が発現し、その活性が高まることを検証できたことから、本発明の有効性を確認することができた。

本発明は、歯周病の炎症に伴う歯槽骨破壊を進行させる破骨細胞の分化誘導に係わる  $\gamma$ -GTP の活性を測定する方法又は同  $\gamma$ -GTP の発現を確認できる検査診断試薬であるから、歯槽骨破壊の早期発見、歯槽骨破壊の進行段階の把握、歯槽骨破壊の進行予測に役立てることができる。

産業上の利用可能性

本発明によって、 $\gamma$ -G T Pに関し、歯周病のマーカーとしての全く新規な用途を提案できる。そして、 $\gamma$ -G T Pの測定方法又は検出方法は、既に医療分野等において確立されている技術を用いて、歯周病の生化学的な検査方法及び検査診断試薬を医療分野に容易かつ迅速に普及させることができる。更には、歯周病の決定的な生化学的検査診断技術を提供できるので、歯周病の早期診断、早期治療に役立てることができる。



### 請求の範囲

1. 歯肉溝滲出液に含まれるγ-グルタミルトランスぺプチダーゼ活性を測定することを特徴とする歯周病の検査方法。
2. γ-グルタミルトランスぺプチダーゼと反応する物質を少なくとも含有する歯周病の検査診断試薬。

## 第 1 図

検 体	$\gamma$ -GTP活性 (U)
1	9. 8
2	15. 9
3	14. 0
4	25. 3
5	21. 5
6	15. 9
7	15. 9
8	6. 1
9	44. 0
10	10. 6
11 (比較検体)	0
12 (比較検体)	0
13 (比較検体)	0
14 (比較検体)	0. 7

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/09493

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>7</sup> C12Q1/48, G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>7</sup> C12Q1/48, G01N33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
BIOSIS/WPI (DIALOG), MEDLINE (STN), JSTPlus (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 4-229198 A (Lion Corp.), 18 August, 1992 (18.08.92), (Family: none)	1-2
P,A	Lianrui, Chu, et al., Role for Recombinant $\gamma$ - Glutamyltransferase from Treponema denticola in Glutathione Metabolism, Infect. Immun., Vol.71, No.1, (2003, January), pages 335 to 342	1-2

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
"E" earlier document but published on or after the international filing date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
09 September, 2003 (09.09.03)

Date of mailing of the international search report  
24 September, 2003 (24.09.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/09493

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 90/09589 A (XYTRONYX Inc.), 23 August, 1990 (23.08.90), & CA 2009813 A & US 4981787 A & EP 412148 A & JP 3-501447 A & ZA 9005960 A & DK 9001791 A & AU 9059782 A & EP 412148 B & DE 69007898 E & ES 2063343 T3 & JP 95004274 B & IL 95177 A	1-2
A	WO 90/04787 A (Univ. Illinois Found. et al.), 03 May, 1990 (03.05.90), & CA 2001434 A & AU 8945174 A & ZA 8908122 A & DK 9001528 A & EP 404887 A & JP 3-502890 A & US 5047328 A & IL 92099 A & EP 404887 B & DE 68915437 E & JP 95004273 B & SG 9401267 A	1-2

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>7</sup> C12Q1/48, G01N33/50		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>7</sup> C12Q1/48, G01N33/50		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
BIOSIS/WPI (DIALOG), MEDLINE (STN), JSTPlus (JOIS)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 4-229198 A (ライオン株式会社) 1992.08.18 (ファミリーなし)	1-2
PA	Lianrui, Chu, et al., Role for Recombinant $\gamma$ -Glutamyltransferase from <i>Treponema denticola</i> in Glutathione Metabolism, Infect. Immun., Vol. 71, No. 1 (2003, Jan.) pp. 335-342	1-2
A	WO 90/09589 A (XYTRONYX Inc.) 1990.08.23 & CA 2009813 A & US 4981787 A & EP 412148 A & JP 3-501447 A & ZA 9005960 A & DK 9001791 A & AU 9059782 A & EP 412148 B & DE 69007898 E & ES 2063343 T3 & JP 95004274 B & IL 95177 A	1-2
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		
の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
09.09.03	24.09.03	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 引地 進	4N 9549
	電話番号 03-3581-1101 内線 3488	

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 90/04787 A (Univ. Illinois Found. et al.) 1990.05.03 & CA 2001434 A & AU 8945174 A & ZA 8908122 A & DK 9001528 A & EP 404887 A & JP 3-502890 A & US 5047328 A & IL 92099 A & EP 4 04887 B & DE 68915437 E & JP 95004273 B & SG 9401267 A	1-2